

④ 公表特許公報 (A)

平1-503275

⑤ 公表 平成1年(1989)11月9日

⑥ Int. Cl.*	第別記号	序内登録番号	審査請求未請求
C 12 N 15/00 1/16		8717-4B K-7421-4B	予備審査請求未請求 部門(区分) 1 (1)
C 12 P 21/00		C-6712-4B	(全 14 頁)

⑦ 対象の名称 酵母ベクター

⑧ 特開 昭63-592934
⑨ 特出 昭63(1988)4月8日

⑩ 論文提出日 昭63(1988)12月8日

⑪ 国際出願 PCT/GB88/00276

⑫ 國際公開号 WO88/06027

⑬ 國際公開日 昭63(1988)10月20日

⑭ 优先権主張 ⑮ 1987年4月9日 ⑯ イギリス(GB) ⑰ 8708495

⑯ 発明者 ヒンクリツフエ、エドワード ⑰ イギリス国 ノットインガムシャー、バートン・ジル、ラムブリイ・レーン 16

⑯ 出願人 デルタバイオテクノロジー ⑰ イギリス国 エヌジー7-1エフディー、ノットインガム、カースル・ブルーバード、カースル・コート(番地なし)

⑯ 代理人 井理士 浅村皓外3名

⑯ 指定国 A T(広域特許), A U, B E(広域特許), B R, C H(広域特許), D E(広域特許), D K, F I, F R(広域特許), G B, G B(広域特許), H U, I T(広域特許), J P, K R, L U(広域特許), N L(広域特許), S E(広域特許)

最終頁に續く

請求項範囲

1. 組換えによって得なわれるDNA配列、その1対が同じ方向性を有し他の2対が逆の方向性を有する5個の2'アミノ酸組換え部位、及び目的とする蛋白質又はペプチドをコードするDNA配列を含むベクターであつて、上記組換えによって得なわれるDNA配列が上面同じ方向性を有する1対の2'アミノ酸組換え部位の間にある2'アミノ酸組換え部位。

2. 選択マーク-DNA配列を含む請求の範囲第1項記載の2'アミノ酸組換え部位。

3. (1) ベクタリップロモ中でのベクターの構造に必要なベクタリップラスマミドDNA配列；(2) エキストラ2'アミノ酸組換え部位；(3) 目的とする蛋白質又はペプチドをコードするDNA配列；及び酵母形質転換用の選択マーク-DNA配列を保持する完全2'アミノ酸組換え部位であつて、2'アミノ酸組換え部位の2つの逆方向反復配列の1つの配列内の側鎖酵素部位に上記ベクタリップラスマミドDNAが存在し且つ上記エキストラFLP組換え部位が接着されており、上記エキストラFLP組換え部位は上記逆方向反復配列の1つの配列内の内因性FLP組換え部位に対して同じ方向性を有しておき、上記ベクタリップラスマミドDNA配列はエキストラFLP組換え部位と上記逆方向反復配列の1つの配列内の内因性FLP組換え部位との間にある完全2'アミノ酸組換え部位を含む請求

の範囲第2項記載の2'アミノ酸組換え部位。

4. 上記制限詳載部位がエキストラXba I部位である請求の範囲第2項記載の2'アミノ酸組換え部位。

5. 全てのベクタリップDNA配列が上記のようにエキストラFLP組換え部位と内因性FLP組換え部位との間にある請求の範囲第2項記載の2'アミノ酸組換え部位。

6. 目的とする蛋白質又はペプチドをコードするDNA配列が酵母に対して表現できる請求の範囲第1項から最も廣いいすれか1項記載の2'アミノ酸組換え部位。

7. 目的とする蛋白質又はペプチドをコードするDNA配列が、BSAをコードするDNA配列であつて、該DNA配列はその酵母が酵母において能動する分部リーダー配列を介して酵母において能動する遺伝子プロモーターと融合しており、その子代株が酵母において能動する転写因子ミネル・ヨンシンゲナルに融合している請求の範囲第6項記載の2'アミノ酸組換え部位。

8. 目的とする蛋白質又はペプチドをコードするDNA配列が、その酵母がDAL/N/CYC13x1DAL/PGKヘイブリッドプロモーターと融合しておりその子代株が酵母において能動する転写因子ミネル・ヨンシンゲナルに融合しているNBT-BSA連鎖子である請求の範囲第6項記載の2'アミノ酸組換え部位。

9. 目的とする蛋白質又はペプチドをコードする遺伝子が、*DEX*-遺伝子、あるいは、その変体が酵母において機能する分泌リガード野型を介して酵母において機能する遺伝子プロモーターに融合しておりその末端が酵母において機能する転写ターミネーションシグナルに融合している *Escherichia coli* のヌクレオカナーゼをコードする DNA 配列である請求の範囲 1 項から第 5 項のいずれか 1 項記載の 2 番プラスミドベクター。

10. 添付した第 5 図の pSAC6 の配列を実質的に有する請求の範囲第 1 項記載の 2 番プラスミドベクター。

11. 請求の範囲第 1 項から第 4 項のいずれか 1 項記載の 2 番プラスミドベクターの製造法であつて、(i)酵母形質転換法を基準するための DNA 配列：①目的とする蛋白質又はペプチドをコードする DNA 配列；及び(ii)バクテリア内でのベクターの増殖を可能にするバクテリアプラスミド DNA と (iii)FLP 製換元部位のコレオントを含む導入用 DNA 配列を、ホモトリPLP 製換元部位がベクター内に作成され且つ互いに逆の方向性を有する 2 つの FLP 製換元部位の間に上記バクテリアプラスミド DNA がはさまれるよう、新規導入用 DNA 配列を完全 2 番プラスミド内に組みすることを含む上記の製造法。

12. 上記導入用 DNA 配列を内臓性 FLP 製換元部位のユニーク *Xba* I 部位に挿入し、新規導入用 DNA 配列の一

方の末端に 2 番プラスミドの長鎖配列の 1 部を有し、他方の末端に 2 番プラスミドの長鎖配列の残りの部分を有する請求の範囲第 1 項記載の取左派。

13. 遺伝子に対して酵母の蛋白質又はペプチドをコードする DNA 配列を含み、バクテリア DNA は含まない 2 番プラスミドベクター。

14. 請求の範囲第 1 項から第 4 項のいずれか 1 項記載の 2 番プラスミドベクターで形質転換された酵母用酵母又は真核真菌酵母。

15. 請求の範囲第 1-4 項記載の酵母を発酵することによって得られる目的とする蛋白質又はペプチド。

16. 目的とする遺伝子が *Sac* B 1 項位に直接的に又は間接的に挿入されている 2 番プラスミドベクター。

明 細 告

酵母ベクター

本発明は、酵母、特に *Saccharomyces cerevisiae* の遺伝子工学に関する。 是

形質転換と言われる工程によつて、要稚 DNA が酵母細胞に取り込まれ、次いで遺伝的に確実されて該 DNA の発現が行なわれる。形質転換についての最初の報告は 1970 年代の後半に行なわれ、その時の形質転換は、酵母の細胞壁を酵素の作用によって除いてプロトプラストを得、これに DNA を加える方法を用いるものであつた (Hsieh et al., 1978; Beggs, 1978)。最近ではインダクト形質転換を用いた形質転換が確立されている (Bisac et al., 1983)。

酵母は適当なプラスミドを用いて形質転換することができ、この目的のために通常、シキトドベクターとして搭載されたプラスミドが使用されており、このシキトドベクターは *Escherichia coli* あるいは酵母のいずれにおいても構築することができる (Hansen et al., 1978; Beggs, 1978; Sambrook et al., 1979)。

pBR 322 (Bolivar, 1978)などの *E.coli* プラスミド DNA 配列が *E.coli* 中に取込されることによつて *E.coli* 中でのベクター DNA の量産が促進され、そ

の結果酵母の形質転換を効率良く行なうことができる。

酵母形質転換の一般的に使用されているプラスミドベクターは次の 2 タイプ別される。即ち、(i) DNA 複製オリジンを有しているために、クロモソーム DNA に依存することなく自己を複製することが出来る複製ベクター；及び(ii)クロモソーム DNA と複製を競争し、宿主細胞中の複製子 DNA として複製し自己を維持するインテグライトベクターの 2 つである。複製ベクターは更に、(i)酵母の同種 2 番プラスミドから得られる DNA 複製オリジンを含む 2 番由来プラスミドベクター；(ii)酵母のクロモソーム DNA から得られる見掛けの複製オリジンを含む自己複製ベクター；及び(iii)既存の DNA 複製オリジンの 1 つを更にコントローラーを含むことが知られている酵母クロモソーム DNA 配列を有するセントロメアプラスミド (CEN) に分けられる。

上記したベクターで有効に酵母を形質転換するためには、複製子 DNA を保持する形質転換体を同定して選択することが必要である。この選択は、ベクター DNA 内に識別可能な表記型を有する遺伝子を導入することによつて達成される。実験室で酵母を形質転換するのに使用するベクターの場合には、LEU 2, URA 3, TRP 1 (Hsieh et al., 1978; Beggs, 1978; Gerband et al., 1979)などの原生質性遺伝子が通常使用され、これらは酵母の栄養要求性における欠損を補救するように作用する。しかしながら、酵母用

酵母及び他の工業用酵素に用いられる酵母はしばしば侵入体であるため栄養要求性を示さず、かつて強力な選択遺伝子に基づいた選択系を利用することが必要である。この点に開拓して、各種の対性を発揮する遺伝子を保持した 2 μm 由来複製アラスミドベクターが報告されている。即ち、108418 (Jimenez et al., 1980 ; Webster et al., 1983)、ハイブロウイシン B (Cruz et al., 1983)、クロラムファンコール (Cohen et al., 1980 ; Heddle et al., 1986)などの抗生素質に対して、及び細胞壁剝離剤スルカメツロンメチル (Felco et al., 1986)、コンパクチン (Rizo et al., 1983)、類 (Henderson et al., 1986)などの他の生物学質に対しても効能を発揮する遺伝子を用いた例がある。

酵母中で組換え遺伝子が肯定的に検索されるるか否かは、形質転換を用いた酵母ベクターのタイプに依っている。前述した 2 つのタイプのベクターのうちで安価なベクターはインテグレートベクターである。酵母のインテグレート形質転換の原理及び実際については文献 (Batziger & Davis, 1982 ; Winston et al., 1983 ; Orr - Weaver et al., 1983 ; Robertson, 1983) に記載されている。一般にインテグレート形質転換は比較的その効率が低く、陰性状インテグレートプラスミドの場合には DNA 1 個当たり約 1~10 個の形質転換体が得られることが報告されている。

アラスミドは細胞 1 個当たり 2 コピーの割合いで有効 (Clarke & Carter, 1980), 1 世代当たりわずかに 1 % が失なわれるにすぎない (Walmsley et al., 1983)。キメラ 2 μm 由来アラスミドは、宿主の株及び株アラスミド中に存在する 2 μm DNA 配列に依つて各種の程度の遺伝的安定性を示す。

2 μm プラスミドは細胞の壁に存在していることが知られている (Neltner & Pragnell, 1979 ; Livingston & Hobbs, 1979 ; Bellay et al., 1980 ; Takeo et al., 1980 ; Sigurdsson et al., 1981) が、メンゲルの方法のように遺伝子を失なく (Livingston, 1977)。2 μm プラスミドを持たない細胞 (e.g.) が、細胞 1 当り 2 μm プラスミドの平均コピー数が 5.0 である半数体酵母集団から 1 世代後で 0.0 0 1%~0.0 1% の割合いで喪失することが示されている (Fletcher & Cox, 1983)。このように低レベルの遺伝的不完全性の原因を説明するものとして、2 μm プラスミドは通常の成長条件下で細胞に対して何らの利点を有していないことが考えられる (Broach, 1982 ; Fletcher & Cox, 1983 ; Sigurdsson et al., 1981)。しかしながら、2 μm プラスミドを有している株について 2 μm プラスミドが成長速度に対してわずかにがら効果を及ぼしていることが報告されている (Walmsley et al., 1983)。 *S. cerevisiae* の各株の株を分析した所、免農用酵母

(Mendes et al., 1979 ; Hicks et al., 1979) しかしながら、酵母クロモソーム DNA と同様性を有するアリー末端を持つ複数 DNA は高い効率 (100~1,000 倍) で酵母を形質転換し、形質転換に用いた DNA は一般に翻訳部位に対して相同意を有する配列中に組込まれる (Orr - Weaver et al., 1981)。従つて、適当な制限酵素を用いてベクター DNA を架橋することによって、形質転換の効率を高め、クロモソームのインテグレート部位を定めることができである。形質転換の効率が十分に高く、かつクロモソーム内に組込まれるターゲット DNA 配列が、宿主細胞の代謝に必要な遺伝子内に組込まれない場合には、免農用酵母の遺伝子的キディフィケーションをインテグレート形質転換を用いることができる。最近、免農用酵母に用いるインテグレート型遺伝ベクターについて報告されている (Yoon, 1985)。

インテグレートベクターは選択を受けずに遺伝的高密度に安定化組みされるが、複数ベクターはこれとは格別して不安定である。遺伝的に組みられる安定性は用いる複数ベクターのタイプに依る。ARS プラスミドは高コピー数で存在し (約 1 個当たり約 2.0~5.0 コピー) 、より安定した傾向にあるが、1 世代当たり約 1.0 % 以上の頻度で失なわれる (Kakuchi, 1983)。しかしながら、ARS プラスミドの稳定性はセントロメアが結合することによって上昇する。セントロメア

(Toda, 1980 ; Aigle et al., 1984 ; Hinchliffe & Daubney, 1986) などの酵母のはほとんどの中には 2 μm プラスミドが存在していることが報告されている (Clark - Walker & Miskos, 1974)。従つて、2 μm プラスミドは常に存在しており、このことが本質的に高密度の遺伝的安定性を有していることを示していると考えられている。

2 μm プラスミドについての遺伝子分析及び分子分析の結果、2 μm プラスミドの複数及び安定性に関して多くの情報が得られている (Volkert & Broach, 1987)。本質的にはこのプラスミドは 6.5~1.8 基対の環状 DNA 分子から成っている (Battley & Dobson, 1980)。そしてこのプラスミドはユニークな二方向性の DNA 構造オーリンを有しており (Newied et al., 1981)、これがすべての 2 μm 由来ベクターの必須成分とされている。2 μm プラスミドは 4 つの遺伝子、即ち REP 1, REP 2, REP 3 及び PLP を含んでおり、これらが細胞 1 遺伝子のコピー数を高く実現に維持するためには必要とされている。REP 1 と REP 2 遺伝子はトランス作用蛋白質をコードしており、この蛋白質は、REP 3 遺伝子座と相互作用して協力して機能を發揮し、細胞分裂の際に 2 μm プラスミドの分離が安定に行なわれるのを可能としめていると考えられている (Volkert & Broach, 1987)。この点に要して、REP 3 遺伝子は、2 μm プラスミド

の安定な分離を行なうシス作用遺伝子型として作成しており、ダ・モザームセントロメアと类似的表現型を有している (Jeyaram et al., 1985; Kikuchi, 1985)。2 kDa プラスミドの重要な特徴は、2つの逆方向反復 DNA 配列 (それぞれ 5' 5' 番端対) が存在することであり、この配列によつて環状分子が 2つのユニーク領域に分離されている。逆方向反復 DNA 配列の間で分子内組換えが起こり、一方のユニーク領域が他のユニーク領域に対して逆方向となり、A 及び B と書かれるプラスミドの構造異性体が生じて *in vivo* で 2つの異性体を有する混合集団が產生される (Beggs, 1972)。2つの逆方向反復配列間での組換えは、PLP と書かれる連鎖子の產生蛋白質によって仲介され、PLP 蛋白質が逆方向反復領域内での高頻度の組換えを仲介することができる。この部位特異的組換えによつて、プラスミドコピー数の増幅が実現されていると考えられている (Fletcher, 1986; Voelker & Breath, 1986; Son et al., 1986; Murray et al., 1987)。

それぞれの逆方向反復配列は、2つの DNA 反復配列サブユニット (異なる回文三角形で示されている) を含んでおり、そのうちの 2つのサブユニットはお互いに向じ方向性を有しており、他 1つのサブルユニットは逆方向であつて 5' 番端対結合部位はスペーサー領域を介して他の 2つのサブルユニットのうちの 1つに結合し

これらのベクターは、内因性のプラスミドの REP 1 及び REP 2 連鎖子によつてコードされる蛋白質をトランス作用蛋白質として用いる必要があるためである。

異種遺伝子を発現して両側的に蛋白質をポリペプチドを高レベルで產生することのできる連鎖子的に修正された酵母を構築する場合は、通常、高コピー数の酵母ベクターを選択することが望ましい。2 kDa 由来ベクターは発現プラスミドとして用いるには非常に好適であることが証明されており、今日ではしばしば 2 kDa 由来ベクターが用いられている (Kingman et al., 1985)。

欧州特許出願 No 86303032, 1 (公開番号 0 201239 A1、出願人デルタ・バイオテクノロジー Ltd.) には、最初のベクター開発等期には異種遺伝子の発現が起こらず、酵母の量が蓄積されその後ビールから酵母を取り出すと異種蛋白質の合成が誘導されるように、工業用酵母株を連鎖子的に修正して発酵用酵母中で異種蛋白質を產生する方法が記載されている。かかる方法は、強力な選択マーカー DUT - 1 と修正された血清蛋白質 L - メチオニルアルギニン (Met - HSA) をコードする連鎖子とを有する 2 kDa 由来ベクターであつて酵母自身の発現がガクタース株等プロモーターによつて酵母レベルで調節されているベクターで、発酵用酵母を形質転換することによつて造成される。上記の方法の実施範囲中に、異種蛋白質の合成量を

している。このスペーサー領域はユニーク Xba I 位を有しており、PLP 遺伝子の生成能を認識しそしてその生成物によつてその末端が切断される。それに隣接している配列は、他の逆方向反復配列に対応する配列に対して特同性を有しており、先づて末端が切断された後で正確に組換えが行なわれる。Andrews らによつて、S. p. スペーサー領域を含む 7' 4' 番端対の配列が PLP 部位特異的組換えには最低限必要であることが見出された (Andrews et al., 1985)。

2 kDa プラスミドの複製系に基づいた酵母ベクターは、2 kDa プラスミドの複製に必須ではない領域に異種 DNA 配列を挿入することによつて構築される (Beggs, 1981)。このようないベクターは基本的に 2つのタイプがある。即ち、(1)全 2 kDa ベクター及び(2) 2 kDa オリジンベクターである。前者の場合には、2 kDa ベクターの全てを有しており、そこには *E. coli* プラスミド DNA をどの各種の具種配列が挿入されている。このよう挿入されたプラスミドは、Citr⁺ (2 kDa 合成) 及び Ctr⁻ (2 kDa 欠損) 表面のいずれにおいても、高い導赤的安産性を有しており高いコピー数で維持される。後者後者の 2 kDa オリジンベクターは、通常、2 kDa の DNA 複製オリジンと 2 kDa の 5' 番端対反復配列のシングルコピーを有する最少 DNA 配列を持つのみであつて、このようないベクターは Ctr⁺ 酵母株でしか維持できない。何故なら、安産に維持されるためには、

最大にするためには次のことを実現するのが必要である。即ち、初発現される連鎖子 (Met - HSA をコードする) の高コピー数；(ii) 非選択性な血清条件下において目的とする連鎖子の導赤的安産性が高いこと；(iii) 発酵用酵母に導入される組換え連鎖子は、酵母及び該酵母のビール並びに異種蛋白質の产生能に必要な効率を与えること；及び(iv) 酵母中に存在する組換え連鎖子は、出来る限り、目的する連鎖子及びそれに隣接する酵母連鎖子に留るべきであること、である。上記例は特に重要であり、通常の発酵用酵母の監視メティム、即ちボツニアが添加された要若葉酸塩や硝イオンなどの無性物質を添加することは望ましくなくまた実用的でない。硝イオンを添加する場合には、工場コストが上昇し、第 1 の発酵生産物であるグルの質に有害で断然し害かい効果を与えることとなる。上記例を要しては、連鎖子的に修正された酵母は、組換えプラスミドのパクテリア由來の配列部分に組換する配列などの余分な DNA 配列を有していないのが望ましい。

本発明者の出版であつて EP - A - 2 517 44 として公開された特許書には、目的する DNA 配列を含有する相同性 2 kDa プラスミド DNA 配列の 2つのコピーが同じ方向性を有しているインテグレートベクターを構築し、このベクターで酵母を形質転換し、次いで得られる形質転換酵母から、目的とする DNA 配列が取込まれて修正された内因性 2 kDa プラスミドを保持する

操作を単純することによって、内臓色2-kbプラスミドを目的とする蛋白質又はペプチドをコードするDNA配列を導入して、酵母細胞を修正する方法が記載されている。インサグレイトベクター自身は、形質転換酵母細胞内で存続できない。相同性2-kbプラスミドDNA配列は、通常はそうではないが、2-kbプラスミド反復配列のコピーであつてもよい。

本発明者は、修正された2-kbプラスミドを導入することによって酵母細胞を形質転換することのできる、上記明細書に記載された方法の要領を見出した。

本発明の方法では、使用するプラスミドベクターは、2つの同じ方向性を有している相同性2-kbプラスミドDNA-FLP組換え部位の間に導入されているバクテリア中でのベクターの増殖を可能にするDNA配列、目的とする蛋白質又はペプチドをコードするDNA配列であつて必ずしも必要ではないが好ましくは酵母に為して長鎖のDNA配列、及び好ましくは選択マーカーDNA配列も含むベクターである。本発明の2-kbプラスミドベクターは、FLP組換え部位の左右のコピーを有しており、その1対は同じ方向性を有しており、他の2対は逆の方向性を有している。このような構造を有するプラスミドベクターで酵母を形質転換すると、バクテリア中でのベクターの増殖を可能にするDNA配列は自然に失われ、プラスミドベクターは、形質転換酵母の内臓色2-kbプラスミドと置換し残る修正2-kbプラスミド

本発明の2-kb台系ダイオインセグレイションベクターは、実験室及び工業用のいずれの酵母も形質転換できることが見出された。このベクターは、細胞1個当たり高コピー数で抱持され且つ非常に高い遺伝的安定性を有している。更には、これまで報告されている他の2-kb由来ベクターと異なつて、本発明のディスインセグレイションベクターは、酵母が形質転換される際に、バクテリアプラスミドDNA配列が自然に除去されるように構造されている。かくして、2-kbプラスミドに導入された目的とする遺伝子が、非選択的生育条件においても余分なバクテリアプラスミドDNA配列が存在することなく細胞1個当たりのコピー数が高い状態で維持される発酵用酵母の遺伝子的正味が高まっている。このようないベクターを用いて遺伝子的に修正された発酵用酵母を標示することにより、目的とする遺伝子のみが発酵用酵母の後の世代まで安定に維持され、これによつて、付加的なDNA配列が酵母の挙動及び/又は酵母によって產生されるペルホの香り並びに特徴が与える有意味な効果を検査できる。

実際には、目的とする遺伝子はいずれの組換え遺伝子であつてもよく、また酵母に対して表現のものでも同種のものでもよい。本発明のディスインセグレイションベクターは例えは、発酵用酵母の λ -HSA遺伝子を完全にインサグレイトするのに用いることができる。この遺伝子は、例えばE-P-A-~~20123.9~~¹⁴⁷¹⁶⁸号明細

となる。この種のプラスミドベクターを以表ダイオインセグレイションベクターとい。このようないベクターで形質転換された酵母は、目的とする遺伝子を含みバクテリアDNAは含まれない修正2-kbプラスミドの多くの別色専外コピーを有しており、これらは非選択的生育条件下において遺伝子が安定化されることが見出されている。

1986年秋の第15回目の「酵母遺伝子及び分子生物学」についてのシンポジウムで、Bruylantsは、2-kb由来プラスミドの組換えによってバクテリアDNA配列が除去されることを報告したが、それは、その系がDNA分子の構造と機能との関係を研究するのに用いることができる事を示唆したものではない。本発明者らは、同様の系が、予期せぬ安定性を有する有効な発現ベクターの構築に用いることができるを見出した。

本明細書で用いる「FLP組換え部位」とは、FLP遺傳子生産物との相互作用の結果、組換えが可能な部位のいずれをも意味する。もしAndrewらの知見(1986)が正しいならば、FLP組換え部位は、通常後述のよつて同定された74 bp配列をその最少配列として有している。実際は、全反復配列の5'タタ終端部以上を含んでいたとしても何んらの特徴もない。

また記載された方法に従つてホスホグリセレートキナーゼプロモーター(PGK)により、あるいは別途E-P-A-20123.9号明細書に記載されたGAL10/CYC1ハイブリッドプロモーターあるいはE-P-A-258067号明細書に記載されたGAL4/PGEプロモーターなどの強制遺伝子プロモーターによつて表現される。

本発明の系によって安定に維持される付加的な遺伝子は、例えば、発酵用酵母での細胞外グルコアミナーゼ酵素の遺伝子を構成するSaccharomyces diastaticusのDX1遺伝子、発酵用酵母でのカンドー1・2・1・4・ダーダクナルカナーゼの遺伝子を規定するBacillus subtilisのD-グルカナーゼ遺伝子(Kinoshita & Box, 1986)などである。このような遺伝子は、遺伝子の発現レベルをコントロールしあげ/又は遺伝子によつて生成される蛋白質が発酵用酵母から分離されるようになり、最初の遺伝子的に修正することができる。

本発明の新しいディスインセグレイションベクターは、E-P-A-20123.9号明細書に記載された工程に用いるのが特に有利である。なぜなら、この工程によれば、目的とする遺伝子はペルホの発現の間は発現されずまた酵母の通常の生育条件下でも発現されず、発酵後の工程で発現されるよう誘導されているためである。従つて、目的とする遺伝子の高レベル発現の

専用と、細胞増殖によって酵母のバイオ mass が合成される時期とが分離されており、これはよって、プラスミドを複数に及ぼす遺伝子表現の影響を最小にすることができる。

本発明のベクターは、(i) バクテリア宿主中の当該ベクターの増殖に必要なバクテリアプラスミド DNA 配列；(ii) キストラ 2 kb FLP 補換え部位；(iii) 目的とする蛋白質又はペプチドをコードする DNA 配列；及び酵母形質転換用の選択マーカー DNA 配列を有する完全な 2 kb プラスミドを含むダイスインテグリションベクター（前記定義の通り）であつて、2 kb プラスミドの 2 つの逆方向反復配列の 1 つの配列内の内因性酵素部位に該バクテリアプラスミド DNA 配列が存在し且つ該エキストラ 2 kb FLP 補換え部位が作用部されていて、該逆方向反復配列の 1 つの配列内の内因性 FLP 補換え部位に對して同じ方向性を有して該エキストラ FLP 補換え部位が存在しており、該エキストラ FLP 補換え部位と該逆方向反復配列の 1 つの配列内の内因性 FLP 補換え部位との間に該バクテリアプラスミド DNA 配列が含まれているダイスインテグリションベクターが好ましい。

このような本発明の好ましいダイスインテグリションベクターは、1 つもしくはそれ以上のバクテリアプラスミド DNA 配列と、2 kb プラスミドから得られる 7-4 優勢對 FLP 補換え部位のエキストラコピーとが

となる。本発明のベクターは完全 2 kb プラスミドに面づくのが好ましい。しかしながら、本発明のベクターが内因性 2 kb プラスミドと共に存在する場合には、該ベクター中に存在する RFP 1, RFP 2, RFP 3, FLP などの遺伝子は、これら遺伝子の生産物であるトランスクレッショナル・アクティベーターとして供給される。これらのすべては複数のキャリアンが必要なものである。

以下に詳述するように、バクテリア DNA 配列を有する挿入用 DNA 配列は、そのそれぞれの末端に反復配列のそれぞれの部分を保持していくともよく、この場合には該挿入用 DNA 配列は、内因性補換え部位が抜換されて新たに 2 つの好ましい FLP 補換え部位が形成されるように内因性反復配列内に挿入され、この FLP 補換え部位はそれぞれ内因性補換え部位と挿入された挿入用 DNA の接頭部部分とからなる。あるいはまた、完全な FLP 補換え部位を挿入用 DNA 配列の一端に導入し、次いで得られる DNA 配列を、バクテリア DNA 配列が内因性反復配列と挿入用反復配列との間で存在するように、内因性反復配列に接続して見付取れて挿入される。挿入用 DNA 配列が、内因性反復配列から離れた位置に挿入される場合には、内因性反復配列と挿入された反復 DNA 配列との間の内因性 DNA 配列はバクテリア DNA 配列とともに除外される。次つてこの DNA 配列が必要な場合には、挿入用反復配列の内因性反復配列から離れた側にくつ好ましくは挿入される DNA 配列上に

挿入された完全 2 kb プラスミドからなる。要には、酵母形質転換用の選択マーカー例えば CUP-1 を共に挿入せんとする遺伝子が、2 kb プラスミドの第 2 の部位に挿入されている。バクテリアプラスミド DNA 配列と酵母 DNA 反復配列とが、全 2 kb プラスミドの 2 つの逆方向反復配列の 1 つのコピー内の例えば Xba I 部位に挿入されている。DNA 反復配列の正しい方向は、プラスミドの機能に必須であり、例えば E. coli での増殖に必要をバクテリアプラスミド DNA は、2 kb プラスミドの FLP 補換え部位の同じ方向性を有する 2 つのコピーの間に有されるようにプラスミドが複数される。DNA 配列の配置は、図 3 図に詳しく説明されている。このように複数することによつて、プラスミドを酵母に導入した時に 2 つの同じ方向性を有する DNA 反復配列の間で発現する部位特異的挿換えによりプラスミドから離れるよう本 DNA の領域内に、バクテリアプラスミド DNA 配列を配置することができる。この部位特異的過挿えは、2 kb プラスミドの FLP 遺伝子産物によって仲介され、この産物は、cir⁺ 細胞を形質転換した場合には酵母の内因性 2 kb プラスミドによって供給され、cir⁻ 細胞を形質転換した場合にはディスインテグリションベクター自身によって供給される。本発明のベクターは、形質転換酵母の内因性 2 kb プラスミドを離さうために使用することができ、まだ組換えは cir⁺ 細胞の方が速く起こる

要にこの DNA 配列の 1 つのコピーを置く必要がある。

目的とする遺伝子を挿入するインテグラル 2 kb プラスミドの部位は、該挿入によるプラスミドコピー数及び遺伝的効率への効果が最少になるように選択される。従つて、RFP 1, RFP 2, RFP 3 及び FLP 遺伝子に対する事を考えないような部位を目的とする遺伝子を挿入するのが好ましく、特に、プラスミドを酵母の cir⁺ 個体株の形質転換に用いる場合にはそのようにしておきたい。

本発明のディスインテグリションベクターの 1 つの有利な特徴点は、それを cir⁺ 個体株に導入した場合にはそれがインテグラル 2 kb プラスミドを変換していふためにバクテリアプラスミド配列が除去されると同時に該遺伝子が内因性 2 kb プラスミドを構成うことができることがある。同様の状態についても酵母の cir⁺ 個体株に導入された完全 2 kb ベクターについても検討されている (Harford & Petersen, 1987)。本発明のディスインテグリションベクターは、酵母株の内因性 2 kb プラスミドを構成するために用いることもできる。

説明した図面においては以下のことが示されている。

図 1 は、プラスミド pBA 112 (Andriano, et al., 1985) を示す。細い線は、バクテリアプラスミド pUC 9 から説明される DNA 配列を示し、太い垂直の四角は、FLP 補換え部位を含む 7-4 優勢對 DNA フラグメ

特許平1-503275(7)

第10図は、³²Pでラベル化した pSAC 3 DNAでブローブした全酵母 DNA のオートラジオグラフィーを示す。

以下に、本発明を実験例により説明する。

実験例1

プラスミドの構成

プラスミド pSAC 1 1 2 (第1図, Andrews, et al., 1985) を、制限酵素 *Bam*H I 及び *Xba*I で同時に消化することでによってプラスミド pSAC 1 1 2 (第2図)を構築した。綿状プラスミド DNA を、0.3 mM dNTP (dATP, dGTP, dCTP, 及び dTTP) の存在下で 7 ℃で 10 分間、DNA ポリメラーゼ I (タレノー)で処理した。DNA をエタノール：クロロホルムで抽出し、エタノール沈殿し、次いで T₄ DNA リガーゼの存在下で 15 ℃で 1 時間キュベートした。連絡された DNA を *E. coli* 株 X C 1 0 6 1 (Casadaban 和 Cohen, 1980) に導入し、得られる形質転換体からプラスミド pSAC 1 1 2 を構築し、Birnboim 和 Doly (1980) の方法によつて同定し分離を行なつた。

以下のようにしてプラスミド pSAC 3 (第3図)を構築した。Ouetineau, et al., (1974) に記載された方法と同様にして DNA テクスから、酵母 2 AM プラスミド DNA を構築した。構築した 2 AM プラスミド DNA を、Medietzzi, et al., (1982) に記載された方法と同様にして、制限酵素 *Xba*I で部分消化し、

Xba I で開裂した pSAC 1 1 2 に連絡した。連絡して得られる DNA を *E. coli* 株 AG 1 (NSL Enzymes Ltd., Cramlington, England から入手した) に導入した。得られるアンピシリン耐性の形質転換体について、プラスミド pST 9 2 (Storms, R.K. et al., 1977) から得た ³²Pラベル化 2.2 キロ塩基対 Eco R I フラグメントとのコロニーハイブリダイゼーションにより (Grunstein 和 Rogness, 1975)、2 AM プラスミドに対する相同意をスクリーニングした。2 AM プラスミドに対する DNA プローブに対して相同意を示すコロニーを単離し、そのプラスミド DNA を制限酵素ケツビング後にリバウンド付した。かくしてプラスミド pSAC 3 を得た。

プラスミド pSAC 3 を制限酵素 *Pst* I で開裂するとによつて、プラスミド pSAC 3 U 1 (第4図)及び pSAC 3 U 2 (第5図)を構築した。綿状 DNA を、0.3 mM dNTP (dATP, dGTP, dCTP 及び dTTP) の存在下で 7 ℃で 10 分間、T₄ DNA ポリメラーゼで処理してプラント末端とした。DNA をエタノール：クロロホルムで抽出し、リゲーションを行なう前にエタノール沈殿を行なつた。プラスミド pSAC 1 1 0 (Seeger, 1981) を、制限酵素 *Hind* II で消化し、DNA フラグメントを 1 メガヘルツのアカロースゲル電気泳動に付した。酵母のURA 3 遺伝子を有する 1.1 キロ塩基対 DNA フラグメントをゲルから単離し (Medietzzi, et al.,

1982), 0.3 mM dNTP (dATP, dGTP, dCTP 及び dTTP) の存在下で DNA ポリメラーゼ I (タレノー)で処理した。1.1 キロ塩基対 *Hind* II フラグメントをエタノール：クロロホルムで抽出し、エタノールを脱水し、上記で処理した綿状 pSAC 3 DNA とプラント末端を連結した。得られる連絡 DNA を *E. coli* 株 AG 1 に導入した。得られるアンピシリン耐性形質転換体について、プラスミド pJDB 1 1 0 から複製される 1.1 キロ塩基対 *Hind* II フラグメントの ³²Pラベル体を用いたコロニーハイブリダイゼーションにより (Grunstein 和 Rogness, 1975)、URA 3 遺伝子に対する相同意をスクリーニングした。URA 3 遺伝子プローブを用いて相同意を示すコロニーから、プラスミド pSAC 3 U 1 (第4図)及び pSAC 3 U 2 (第5図)を単離した。また、URA 3 遺伝子を含む 1.1 キロ塩基対 *Hind* II DNA フラグメントを、pSAC 3 のニードル *Sac* I 部位及び *Sna*B I 部位にプラント末端で連結して、pSAC 3 U 0 (第6図)及び pSAC 3 U 0 (第7図)と命名されたプラスミドをそれぞれ得た。

プラスミド pST 1 3 : 1 (Henderson, et al., 1985) から得られる CUP 1 遺伝子を保持する 694 塩基対 *Xba* I - *Xba* I DNA フラグメントを、pSAC 3 のユニーク *Pst* I 部位へプラント末端で連結することによつて、プラスミド pSAC 3 U 1 (第6図)を構築した。

プラスミド pSAC 5-U1 及び pSAC 5-U2 による酵母の形質転換

ダイエインチグレイシヨンベクター pSAC 5-U1 (第 6 図) 及び pSAC 5-U2 (第 3 図) は、2 μm 8 フォームのユーロー *Pst* I 部位に挿入された選択酵母遺伝子 URA3 をそれぞれ含むよう構築されている。更にはそれぞれのプラスミドは、同じ方向性を有する FLP 補換部位の 2 つのロギーに接しているバクテリアプラスミド pUC 9 から得られる DNA 配列を保持している。pUC 9 DNA の位置は、これらと同じ方向性を有する 2 つの FLP 補換部位の間での FLP を介しての組換えが起こり、その結果、酵母の形質転換の際にバクテリアプラスミド DNA が除去されるより左位置にある。110 (1983) の方法に従って、プラスミド pSAC 5-U1 及び pSAC 5-U2 で、牛乳酵母株系 S 150-2B の *cir*⁺ 及び *cir*⁰ 遺傳体株 (Singapore, et al., 1986) を形質転換してウランセル選択基質とした。得られた URA 形質転換体について、Chevalier & Aigle (1979) の方法により、酵母でのターラクタム特異的酵素ターラクタマーゼをコードするバクテリア *bla* 遺伝子の遺傳的承継性をスクリーレンジした。第 9 図にその結果が示されており、それによれば、両者のプラスミドは、全ての *cir*⁰ 株の形質転換体において URA⁺ 遺伝子から *bla* 遺伝子を分離 (segregate) しており、酵母の形質転換の際に、プラスミドからバクテリア DNA 配列が

除去されたことを示している。しかしながら、*cir*⁺ 株の pSAC 5-U1 遺伝子供体の大部 分については、*bla* 遺伝子が選択的に除去されていることが観察されていることとが観察された (pSAC 5-U1 については 20 のうち 15 株, pSAC 5-U2 については 20 のうち 18 株)。これらのデータから、プラスミドの分析、即ち FLP によるバクテリアプラスミド DNA 配列の除去は、*cir*⁺ 株より *cir*⁰ 株の形質転換の際により多く生じることが示されている。

形質転換体の分子分析

bla 遺伝子を分離した URA⁺ 形質転換体 (即ち、ターラクタマーゼ・ネガティブ・クローン, *bla*⁻) が、実際に *bla* 遺伝子とそれに連鎖したバクテリアプラスミド DNA 配列を失なっているか否かを調べるために、酵母 DNA を分析した。pSAC 5-U1 又は pSAC 5-U2 で形質転換された *cir*⁺ 及び *cir*⁰ 株の 2 つの URA⁺ *bla*⁻ 形質転換体を、ウラシルを含まない選択最少培地で培養せしめて、以下に示す方法でその全 DNA を抽出した。よく生育した細胞を採取し、それらを、1% ソルビトール、0.025 M エテレンジアミノテトラ酢酸 (EDTA) pH 8.0、8% /w/v グリセロールのうち 2.8% ± 1.5 分間再懸濁した。次いで、細胞を採取し、1.2 M ソルビトール、0.1 M クエン酸ナトリウム、0.01 M EDTA pH 5.0、0.025 M /w/v ジサイモリテーゼ (キリンホール, No. 114) のうち 2.8% で、プロトゲラストが得られるまで透壁濁した。得られるプロトブ

ラストを、1.2 M ソルビトールでも回収し、5% サルコタム、0.5 mM トリス / HCl pH 7.5、0.2 M EDTA、1.0% /w/v プロテインアーゼ K の 1 時間に 5.5% ± 0.0 分間再懸濁した。クロロホルム / イソプロピノール、フェノール、クロロホルム、次いでエーテルで DNA 提取液を抽出し、1.0 mM トリス / HCl、1 mM EDTA pH 8 に対して透析した。酵母全 DNA を、核酸酵素 EcoRI, Xba I 及び *Pst* I で消化し、得られた DNA フラグメントをアガロース電気泳動で分離した。サザン blotting 法 (Maniatis, et al., 1982) に従い、酵母全 DNA を ³²P ラベル化 pSAC 5-DNA でハイブリダイズさせた。その結果は第 10 図に示されており、第 10 図は、³²P ラベル化 pSAC 5-DNA でプローブされた酵母全 DNA のターラクタマーゼを示している。プラスミド pSAC 5-U1 又は pSAC 5-U2 で形質転換された S 150-2B の *cir*⁰ 株から DNA を準備した。それぞれの株 / プラスミドの組合せの 2 つの形質転換体を A, B と命名し、それらを分析した。DNA は次のように核酸酵素で消化した。

Xba I : トランク 1 - 4 及び 21 - 24
Pst I : トランク 6 - 12
 EcoR I : トランク 13 - 20.

トランク	プラスミド	<i>cir</i> ⁺ / <i>cir</i> ⁰	座標 (A/B)
6, 14, 22	pSAC 5-U1	<i>cir</i> ⁺	A
6, 16, 24	pSAC 5-U1	<i>cir</i> ⁺	B
5, 15, 21	pSAC 5-U1	<i>cir</i> ⁰	A
7, 15, 23	pSAC 5-U1	<i>cir</i> ⁰	B
2, 10, 18	pSAC 5-U2	<i>cir</i> ⁺	A
4, 12, 20	pSAC 5-U2	<i>cir</i> ⁺	B
1, 9, 17	pSAC 5-U2	<i>cir</i> ⁰	A
3, 11, 19	pSAC 5-U2	<i>cir</i> ⁰	B

酵母の内因性 2 μm プラスミドに存在する公知の制限酵素部位 (Bartley & Donelson, 1980) 及び選択用プラスミド pSAC 5-U1 及び pSAC 5-U2 に基づき、プラスミド pSAC 5 に対するハイブリダイゼーションパターンを予想することが出来る。予想されるハイブリダイゼーションパターンを第 1 図に示した。

特表平1-503275(9)

カクコ内に示した数字は、分裂したプラスミドが PLP による内部変換を受ける場合に生じるクラグメントを示すものである。

ハイブリダイゼーションの結果(図10図)とその予想(表1)とを比較すると、それぞれの形質転換体において、同じ方向を有する PLP 検出部位内にあるバクタリアプラスミド DNA 斷片の除去に相当する欠失を複数のプラスミドが受けたことがわかる。更には、 pSAC302 と命名された形質転換体の場合には、 S150-2B の内因性 2 ループプラスミドはもはや存在していない。このことは、プラスミド pSAC302 で *cit*⁺ が形質転換されることによって内因性 2 ループプラスミドが無くなれたことを示している。

更に、プラスミド pSAC301 と pSAC302 が酵母の形質転換の際にバクタリアプラスミド DNA 断片の除去を受けたことは、³²P-ラベル化 pUC9DNA (Vieira & Messing, 1982) に対して上記した DNA 特異物のハイブリダイゼーションから明らかである。URA⁺ dia⁻ 無性孢子芽は、この DNA オリゴーに対してもハイブリダイズしなかつた。

酵母形質転換の際のプラスミド pSAC300, pSAC310 及び pSAC1 の分析

URA⁺ プラスミド pSAC300 及び pSAC310 を用いて、 S150-2B の *cit*⁺ 及び *cit*⁻ 菌株を形質転換し、得られる形質転換体の URA⁺ dia⁻ 無性孢子芽を調べた。

解説が述べているととを確認した。即ち、上記した ³²P-pUC9DNA に対して酵母全 DNA をハイブリダイズさせた所、 dia⁻ 無性孢子芽については何らの相間性も検出されなかつた。

* 分離形質転換体のプラスミド安定性

pSAC301, pSAC302, pSAC300 及び pSAC310 の分離されたプラスミド酵母株を保持する S150-2B の *cit*⁺ 及び *cit*⁻ 菌における URA⁺ 異型の遺傳的多様性を、 2 本の vTF-DNA を各 YPD 中で振盪培養して酵母を生育せしめ、同じ量少培地上にプレートし、あるいはケラルを欠いた最少培地にシダリカプレートすることによって調べた。 1 世代当たりのプラスミド欠損ペーセントを計算し、表2に示した。

表2

1 世代当たりのプラスミド欠損ペーセント

プラスミド酵母株 (分離されたバクター)	1 世代当たりのプラスミド欠損ペーセント	1 世代当たりのプラスミド欠損ペーセント
	S150-2B	S150-2B
	<i>cit</i> ⁺	<i>cit</i> ⁻
pSAC301	0.22	0.19
pSAC302	0.31	0.14
pSAC300	2.5	-
pSAC310	0	0.89

表1
pSAC301 及び pSAC302 で形質転換された S150-2B-cit⁺ 及び S150-2B-cit⁻ 菌株の形質転換体に対する予測ハイブリダイゼーション

プラスミド DNA	形質転換体			
	(キロ塩基対)	Xba I	Dra I	Xba I
2 μm (内因性)	4.1 5.9 2.4 2.2	5.2 5.1 2.8 2.8	6.5	10.2
pSAC301 及び pSAC302 (インサート)	5.5 4.1 0.72	4.6 5.2 4.5	7.4	7.4
pSAC301 及び pSAC302 (分解した)	(5.0) 4.1 3.5 (2.4)	5.2		

全ての場合において、それらの表現型が失われてゐることが観察された。即ち、 pSAC300 及び pSAC310 の酵母の形質転換の際にバクタリアベクター DNA を除去することができる。この点に関して、プラスミド pSAC300 の場合には、 S150-2B の *cit*⁺ 酵母体の dia⁻ 形質転換体が有意に高い比率で生じることが観察された。このことについてはどのように説明すべきかは判らない。しかしながら、次の可能性がある。即ち、 pSAC300 の pUC DNA 3 連性子が挿入されたことによつて *lacZ* 基因が抑制され、酵母している ELP 連鎖子の発現が障害を受け、その結果 ELP レコンビナーゼの活性が高くなつた可能性がある。

プラスミド pSAC301 を、発酵業工通用酵母、特に発酵用酵母の形質転換に用いることを試みた。即ち、 Hinselhoff と Daubney (1986) に記載されている *Ba55* ライナー・ビール酵母 BE 1.1.0 を pSAC301 で形質転換した。次いで、得られた発酵用形質転換酵母について、ターラクタマー・ゼオレート・アソセイ配列より既に形質転換が存在するか否かをテエクタした。テスルした形質転換体の約 1/3 分が dia⁻ 異型を示し、このことは、発酵用酵母宿主においてプラスミド pSAC301 の *in vivo* 分離が降つたことを示している。

プラスミド pSAC300, pSAC310 及び pSAC301 の *in vivo* 分離について、数段階が失われた適当な宿主株の分子上の特徴付けを十分に行なうことによつて分

特表平1-503275 (10)

表2の結果から判るように、すべての分離された（ダイスインテグレートされた）ベクターは、S1 50 - 2 S の *cit*⁺ 及び *cit*⁰ 脱落菌株中で不安定である。しかしながら、酵母 pSAC301, pSAC302 及び pSAC310 の不安定性のレベルは、S1 50 - 2 S 中での他の URA⁺ 2 μm 血球酵母ベクター (Cesnoves, et al., 1986) よりも少なくともランダムである。

pSAC302 がプラスマト部分のユニーク *Eco*I 部位に URA 3 遺伝子を挿入することによって、pSAC301, pSAC302 及び pSAC310 から新規される分解されたプラスミド酵母体よりも安息香酸高い分解されたプラスミド酵母体が得られることは極めて確実である。従つて、遺伝子ベーカーの挿入部位が、得られる分解されたプラスミド酵母体の不安定性に対して大きな効果を与えることが明らかである。この点に関して、2 μm プラスマトのユニーク *SacB* 及び *Pst* I 部位が酵母を遺伝子の導入に適した遺伝子組を形成することが明らかである。何故なら、このような組合への導入によってプラスミドの安定性が改善されないからである。

発酵用酵母の“分解”酵母細胞でのプラスミド安定性

SB 1 1.0 の pSAC301 形質転換体の分解されたプラスミド酵母体を有する分解形質転換体について、酵母形質転換の安定性を調べた。上記したと同様にして得

られた質度検査実験を行なつた所、非選択的培養条件下で 1 世代当り 0.014 % のプラスミド消失が観察された。この結果から、pSAC301 の分解されたプラスミド酵母体は酵母形質転換 SB 1 1.0 中で非常に安定であり、後者に由来するベクターについてこれまで観察されたことのない程度の安定性を有している。酵母中で目的とする遺伝子を安定に維持するためにダイスインテグレーションベクターを強化することができる。

プラスミド pSAC302 はユニーク *Pst* I 部位及びユニーク *SacB* I 部位を有しており、これらのいずれか DNA 配列を導入しても、酵母でのプラスミドの分解酵母体の増殖度の安定性に對して悪い影響を及ぼすことなく、DNA 配列を導入することができる。これらの部位は、目的とする遺伝子、例えば S. diastaticus の DEX-1 遺伝子及び酵母プロモーターで充填されると、血清アルブミン遺伝子の導入のための遺伝子型として用いることができる。公知の方法を用いて、酵母形質転換体の選択ベーカーとともにこのよう遺伝子をこのようカニード遺伝子部に導入することができる。あるいは、プラスミド pSAC301 + pSAC302, pSAC310 及び pSAC301 は、目的とする遺伝子を導入するための欠き部として用いることができる。この点に関しては、プラスミド pSAC301, pSAC302 及び pSAC310 は、URA 3 遺伝子の S. 酵母形質転換 SB 1 *Sac* I 部位を有し

Beggs, (1981). In: "Molecular Genetics in Yeast" Alfred Benson Symposium No: 16. Munksgaard, Copenhagen.

Birnboim & Doly, (1980). Nucleic Acids Research, 7, 1513.

Bolivar, (1978). Dene, 4, 121.

Borstein & Davis, (1982). In "The Molecular Biology of the Yeast. Saccharomyces: Metabolism and Gene Expression". Eds. Strathern et al., Cold Spring Harbour Laboratory, New York.

Broach & Hicks, (1980). Cell, 21, 501.

Casadaban & Cohen, (1980). Journal of Molecular Biology, 158, 179.

Cashmore, et al., (1986). Molecular and General Genetics, 205, 154.

Chevallier & Aigle, (1979). FEBS Letters, 106, 179.

Chevallier, et al., (1980). Dene, 11-11.

Clarke & Carbon, (1980). Nature, 287, 504.

ている (Rose et al., 1984)。との *Sac* I 部位を、適當な目的とする遺伝子を導入するための遺伝子座として用いることができる。

目的とする遺伝子を直接的にあるいは間接的に導入するために（例えば URA 遺伝子を導入し、次いでその *Sac* I 部位に目的とする遺伝子を導入するよりを結合） *Sac* I 部位を用いることが望ましい面からは、ベクターの分解に依っている。即ち、バクテリア DNA 配列の結合に依っており、このことが本発明の他の 1 つの優點を形成している。一般に、導入された遺伝子から内因性 2 μm 領域、特に酵母の複数オリジン (*ori*) から離れた *Sac* I 部位後の STB 領域まで転写が行なわれるのを止めるのが望まれている。従つて、導入される配列は、(a) 目的とする遺伝子、(b) その *ori* 供給部に接続した部位上にあるプロモーター及び(c) 目的とする遺伝子の下流であつて且つ量的とする遺伝子と STB 領域との間にある S. 酵母ターミネーターからなるのが好ましい。

引用文献

Aigle, et al., (1984). Journal of the American Society of Brewing Chemists, 62, 1.

Andrews, et al., (1985). Cell, 40, 795.

Beggs, (1978). Nature, 273, 104.

特表平1-503275 (11)

Clark-Walker & Mirkes, (1974), European Journal of Biochemistry, 41, 359.

Cohen et al., (1980), Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 77, 1078.

Falco & Dumes, (1985), Genetics, 109, 21.

Futcher, (1986), Journal of Theoretical Biology, 119, 197.

Futcher & Cox, (1985), Journal of Bacteriology, 154, 612.

Gerbaud et al., (1979), Gene, 5, 235.

Grive et al., (1983), Gene, 26, 178.

Grunstein & Hogness, (1975), Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 72, 5961.

Guerineau, et al., (1974), Biochemical Biophysics Research Communications, 61, 462.

Hadfield, et al., (1986), Gene, 45, 147.

Harford & Gettys, (1985), DNA, 4, 60.

Harford & Peters, (1987), Current Genetics, 11, 515.

Hinchliffe & Box (1986), Proceedings of the European Brewery Convention Congress, 20th, Helsinki, 267.

Hinchliffe & Daubney (1986), Journal of the American Society of Brewing Chemists, 44, 98.

Himmen et al., (1978), Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 75, 1929.

Ito et al., (1983), Journal of Bacteriology, 155, 163.

Kymar, et al., (1982), Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 79, 1578.

Jayaram, et al., (1983), Cell, 34, 95.

Jiminez et al., (1980), Nature, 287, 869.

Kikuchi, (1985), Cell, 35, 487.

Kingsman, et al., (1983), Biotechnology and Genetic Engineering Reviews, 3, 377.

Livingston, (1977), Genetics, 86, 73.

Livingston & Hobbs, (1979), Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 76, 3727.

Mancini et al., (1982), In: "Molecular Cloning: a Laboratory Manual", Cold Spring Harbour, New York.

Murray et al., (1987), The EMBO Journal, 6, 4205.

Nelson & Pangman, (1979), Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 76, 6515.

Newlon, et al., (1981), ICN-UCLA Symposium on Molecular and Cellular Biology, 22, 501.

Orr-Weaver, et al., (1981), Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 78, 6354.

Orr-Weaver, et al., (1985), In "Methods in Enzymology", Eds. Wu, et al., 101, 228, Academic Press, New York.

Rice, et al., (1983), Proceedings of the

National Academy of Sciences, USA, 80, 6750.

Rose et al., (1984), Gene, 29, 153.

Robtstein, (1985), In "Methods in Enzymology", Eds. Wu, et al., 101, 202, Academic Press, New York.

Selby et al., (1983), Nucleic Acids Research, 11, 3371.

Sigurdsson et al., (1981), Molecular and General Genetics, 183, 59.

Som et al., (1988), Cell, 52, 27.

Storms, et al., (1979), Journal of Bacteriology, 140, 73.

Straul et al., (1979), Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 76, 1055.

Taketo et al., (1980), Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 77, 3144.

Tubb, (1980), Journal of the Institute of Brewing, 86, 78.

Vierra & Messing, (1982), Gene, 19, 259.

Volkert & Broach, (1986), Cell, 44, 541.

Volkert & Broach, (1987), In Press.

Walmsley, et al., (1985), Molecular and General Genetics, 192, 561.

Webster & Dickson, (1983), Gene, 26, 245.

Winston, et al., (1985), In "Methods in Enzymology", Eds. Wu, et al., 101, 211.

Wu, et al., (1985), In "UCLA Symposium on Molecular and Cellular Biology: Yeast Cell Biology", Ed. Hicks, 523.

Yacub, (1985), 取得特許出願 No 163491.

組換え酵母においては、同じ方向を有する2つのPLP組換え部位のあと、希望しない例えはそれらの間にあるベクターチアDNA（例えば組換え部位のペアによって分離されたプラスミドの2つの部分の並い配列として）とを含むプラスミドを構築してもよい。組換えは、このようなプラスミド江1個の組換え部位を有し、並つて逆方向の2つの組換えを起こさず、A型など他の組合せはならない。このようなプラスミドが上記したプラスミドよりも不安定であるが、平発酵の1菌群を形成しそのものもグレードされる。

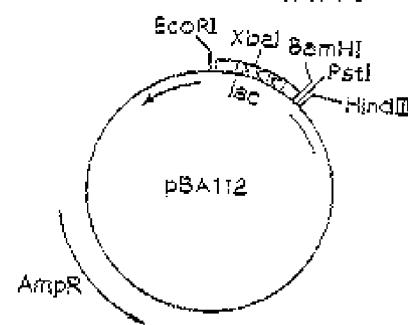


Fig. 1

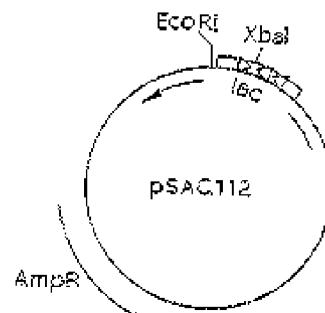


Fig. 2

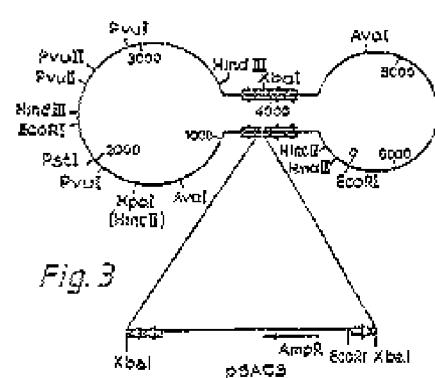


Fig. 3

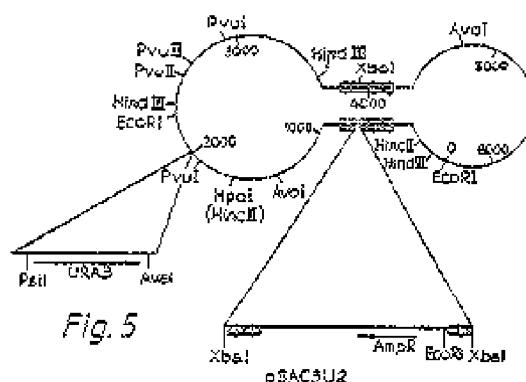


Fig. 5

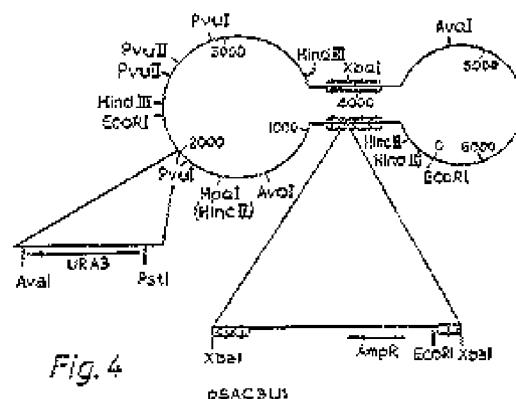


Fig. 4

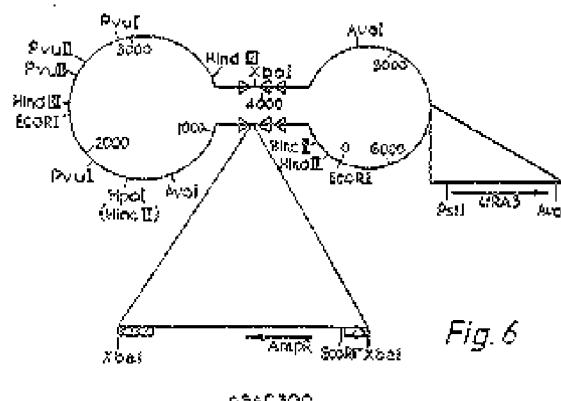


Fig. 6

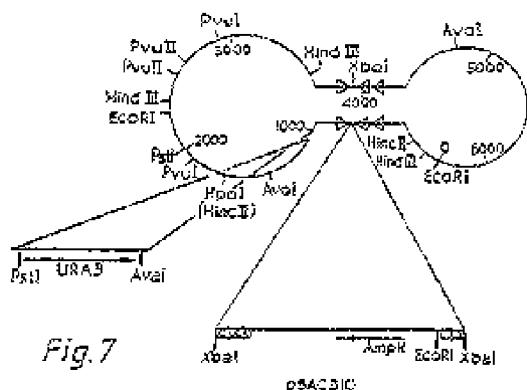


Fig. 7

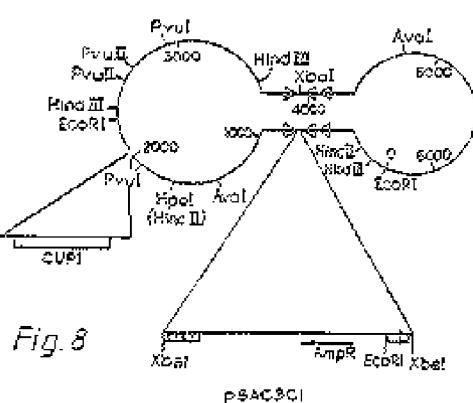


Fig. 8

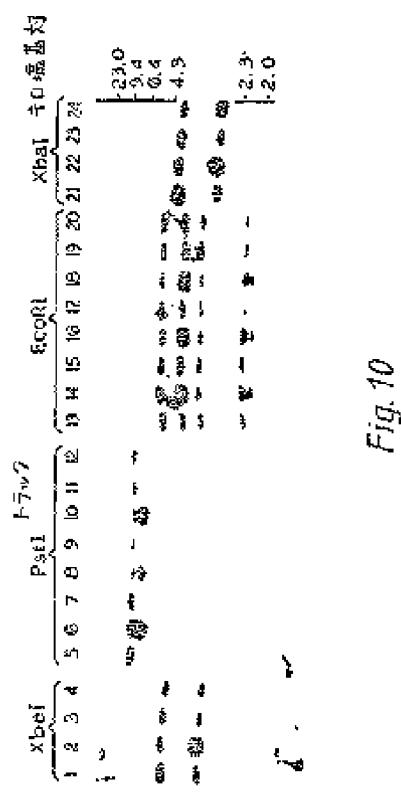
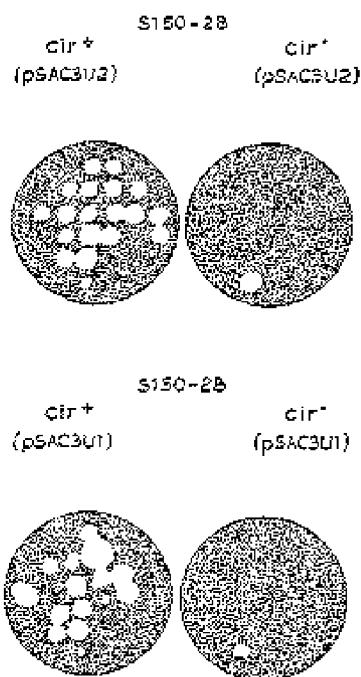
Fig. 9 URA3及びbla^rの遺伝的結合

Fig. 10

日本特許公報

特許出願番号: 022/02 66/00275	
1. 本発明の概要	
本発明は、酵母細胞内に外因性DNAを導入する方法に関するものである。	
2. 本発明の技術的範囲	
本発明は、酵母細胞内に外因性DNAを導入する方法に関するものである。	
3. 本発明の詳細な説明	
本発明は、酵母細胞内に外因性DNAを導入する方法に関するものである。	
4. 本発明の実施例	
本発明は、酵母細胞内に外因性DNAを導入する方法に関するものである。	
5. 本発明の効果	
本発明は、酵母細胞内に外因性DNAを導入する方法に関するものである。	
6. 本発明の特徴	
本発明は、酵母細胞内に外因性DNAを導入する方法に関するものである。	
7. 本発明の実施例	
本発明は、酵母細胞内に外因性DNAを導入する方法に関するものである。	
8. 本発明の効果	
本発明は、酵母細胞内に外因性DNAを導入する方法に関するものである。	
9. 本発明の特徴	
本発明は、酵母細胞内に外因性DNAを導入する方法に関するものである。	
10. 本発明の実施例	
本発明は、酵母細胞内に外因性DNAを導入する方法に関するものである。	
11. 本発明の効果	
本発明は、酵母細胞内に外因性DNAを導入する方法に関するものである。	
12. 本発明の特徴	
本発明は、酵母細胞内に外因性DNAを導入する方法に関するものである。	
13. 本発明の実施例	
本発明は、酵母細胞内に外因性DNAを導入する方法に関するものである。	
14. 本発明の効果	
本発明は、酵母細胞内に外因性DNAを導入する方法に関するものである。	
15. 本発明の特徴	
本発明は、酵母細胞内に外因性DNAを導入する方法に関するものである。	
16. 本発明の実施例	
本発明は、酵母細胞内に外因性DNAを導入する方法に関するものである。	
17. 本発明の効果	
本発明は、酵母細胞内に外因性DNAを導入する方法に関するものである。	
18. 本発明の特徴	
本発明は、酵母細胞内に外因性DNAを導入する方法に関するものである。	
19. 本発明の実施例	
本発明は、酵母細胞内に外因性DNAを導入する方法に関するものである。	
20. 本発明の効果	
本発明は、酵母細胞内に外因性DNAを導入する方法に関するものである。	
21. 本発明の特徴	
本発明は、酵母細胞内に外因性DNAを導入する方法に関するものである。	
22. 本発明の実施例	
本発明は、酵母細胞内に外因性DNAを導入する方法に関するものである。	
23. 本発明の効果	
本発明は、酵母細胞内に外因性DNAを導入する方法に関するものである。	
24. 本発明の特徴	
本発明は、酵母細胞内に外因性DNAを導入する方法に関するものである。	

数据采集报告

22 0399276

14. ~~REF ID: A7820~~ COMBINED TO BE MAILED - (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)

Comments: Change for Captain with whom you will talk after the interview has been completed

Priority: Opt-in

A 2D. A. 014719Z (SASE POSTAGE 100) 3 July
1988, See S1228; page 31, line 23 -
Page 28, line 34 -----

PERIODIC ACCOUNT NAME & IDENTIFICATION	PURCHASE AMT	DISBURSEMENT AMOUNT	PURCHASE DATE
EP-A- 0203209	12-11-86	GR-A- 2175590 JP-A- 61283087 AU-A- 6544836	91-12-86 12-12-86 CE-11-82
W0-A- 6705006	21-05-87	AU-A- 6175407 JP-A- 6245483	04-06-87 15-11-87
EP-A- 0187138	08-07-86	AU-A- 3704134 JP-A- 60250368	18-07-86 18-12-86

第1頁の表記

優先権主張 @1987年8月3日@イギリス(GB)@8718347
②発明者 チネライ, シモン アンドリュイ イギリス国 エヌジー13 8イーティー, ノッティンガムシャー,
- ピンガム, マスターズ ロード, 4